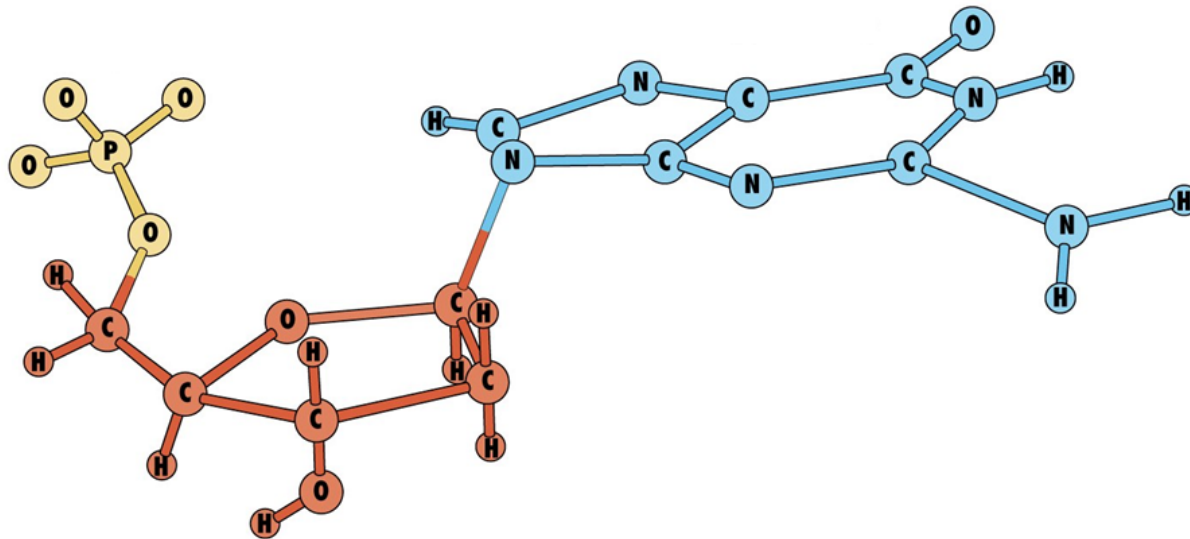


# ESTRUCTURA DE LOS ÁCIDOS NUCLEÍCOS

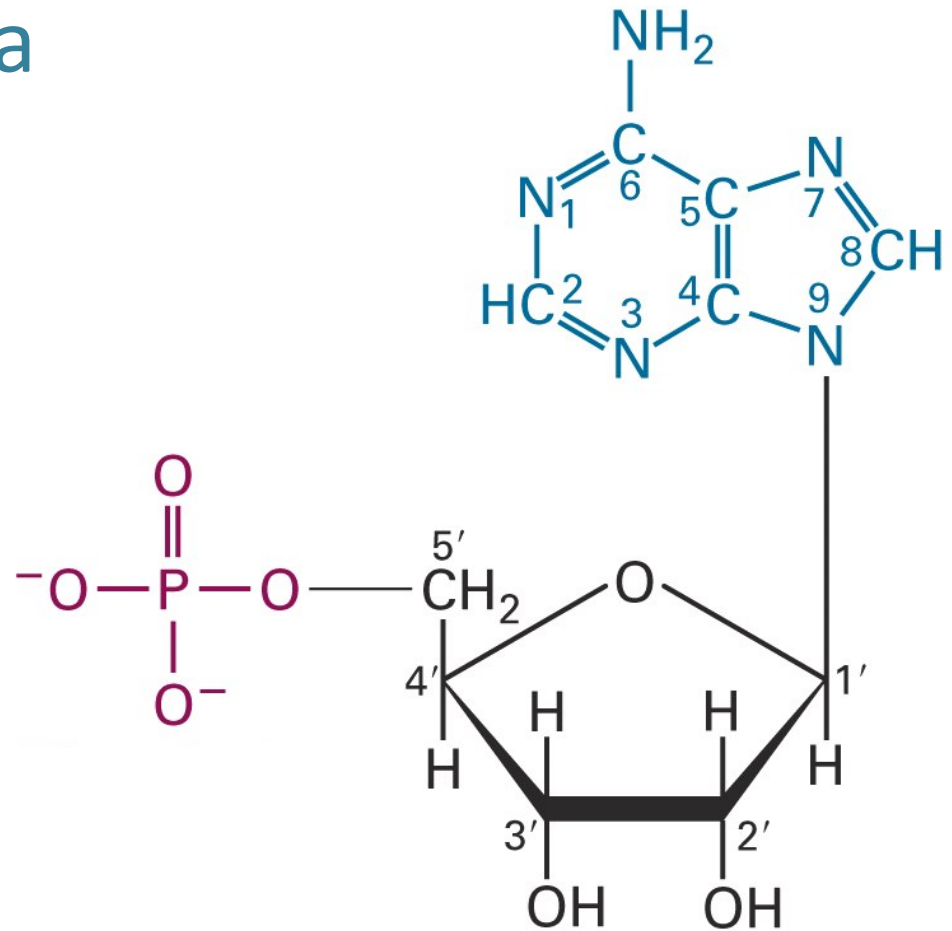


# Nucleótido

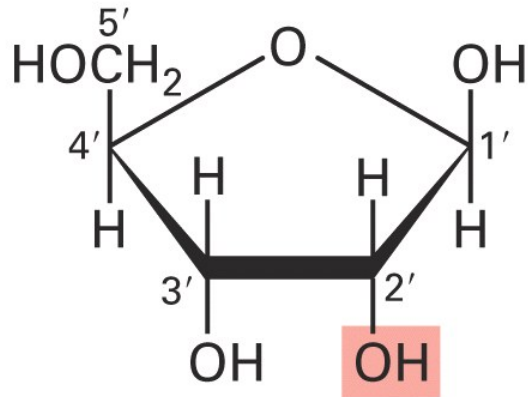
Base Nitrogenada

Pentosa

Grupo Fosfato

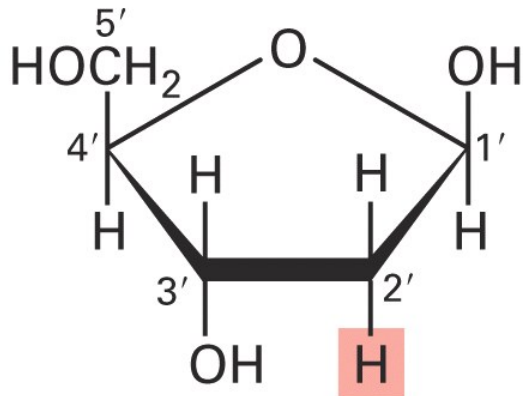


# Pentosa



**Ribose**

**ARN**



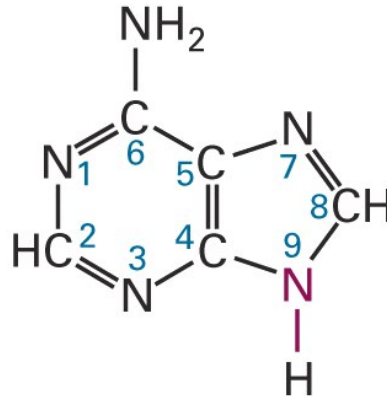
**2-Deoxyribose**

**ADN**

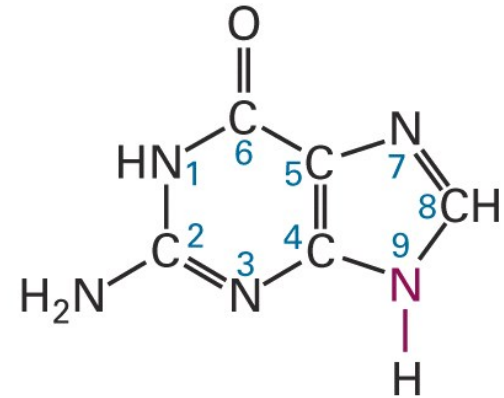
# Bases Nitrogenadas

## Purinas

Adenina (A)

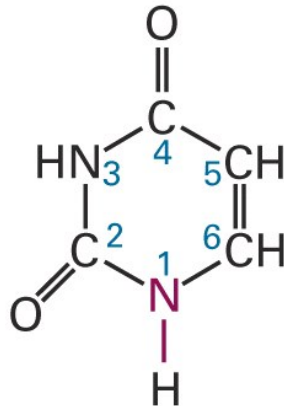


Guanina (G)

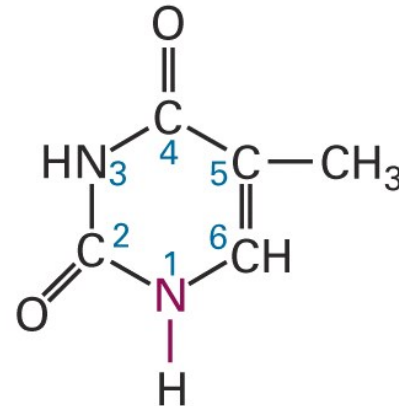


## Pirimidinas

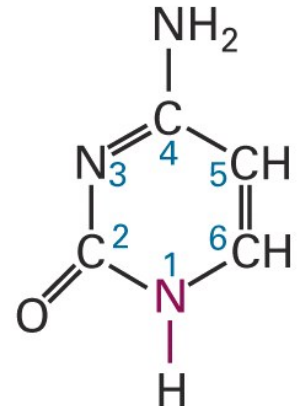
Uracilo (U)



Timina (T)

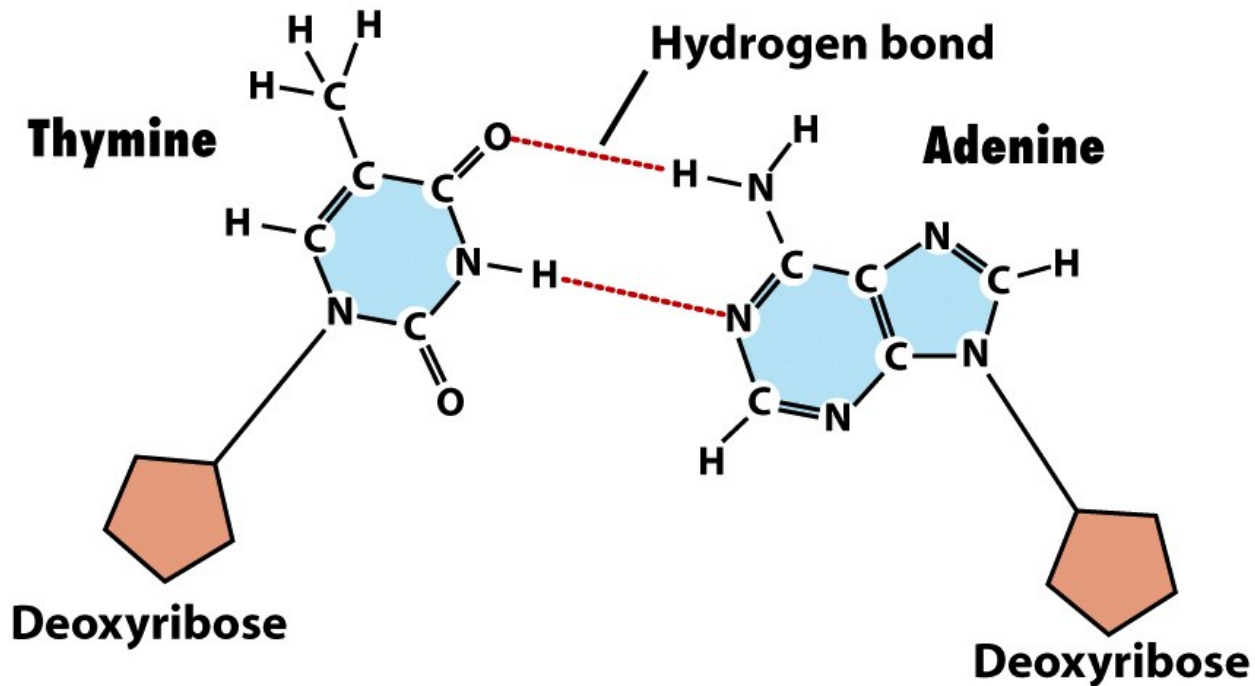


Citosina (C)



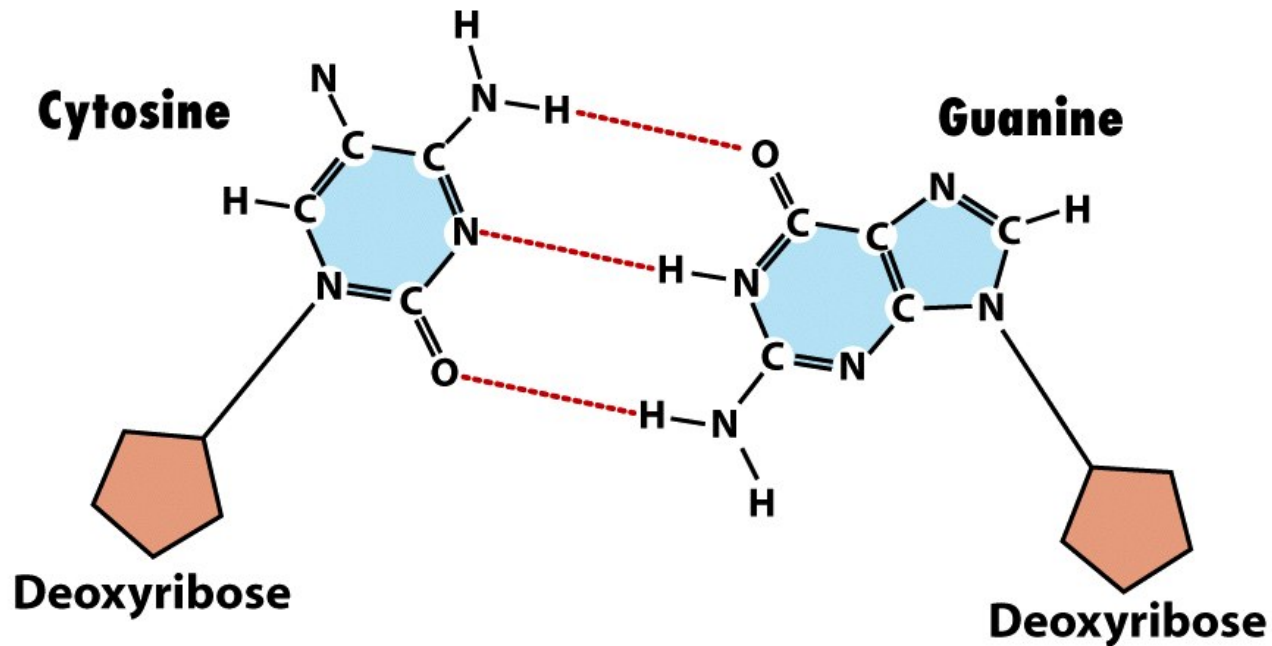
# Apareamientos Watson-Crick

La adenina se  
aparea con la timina



# Apareamientos Watson-Crick

La guanina se  
aparea con la citosina



# Estructura del ADN

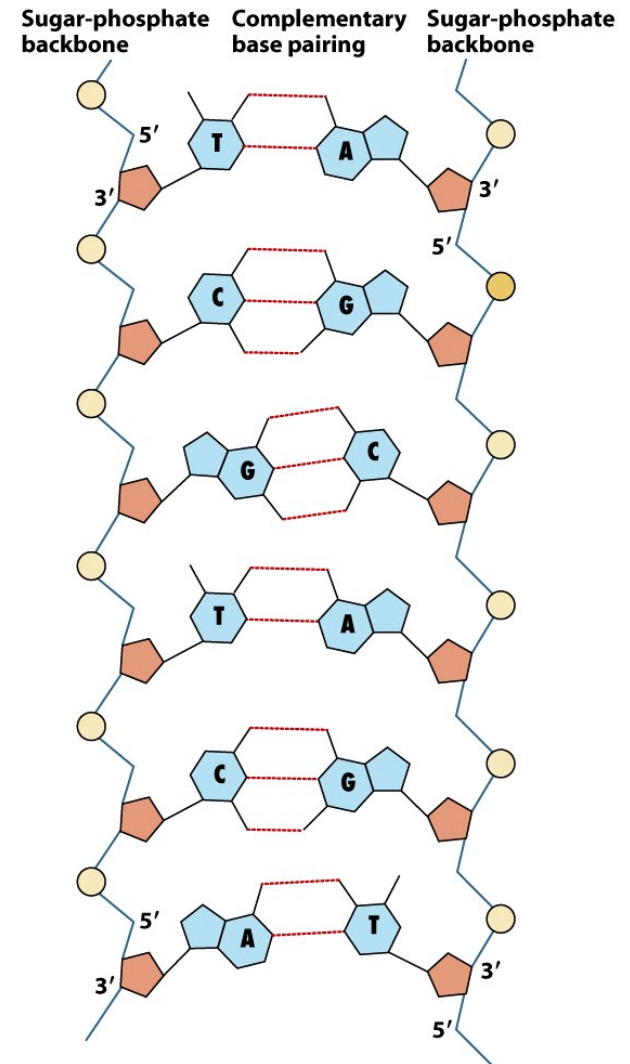
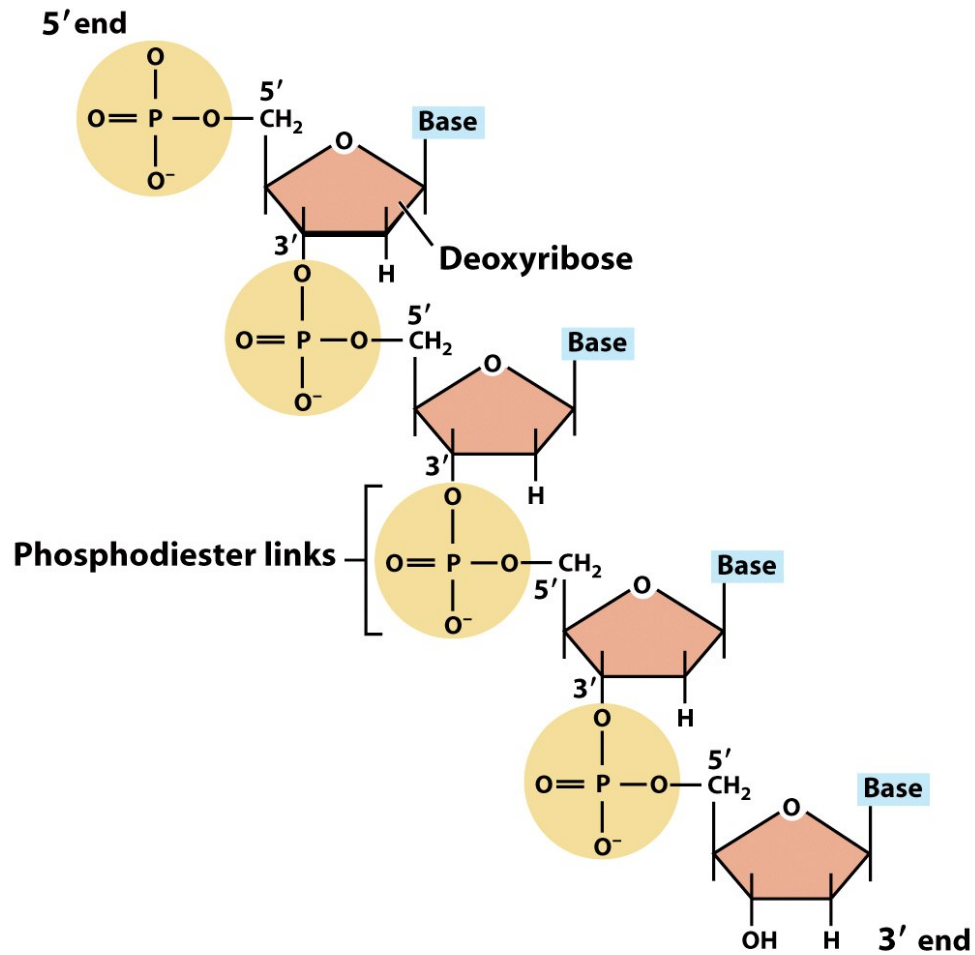
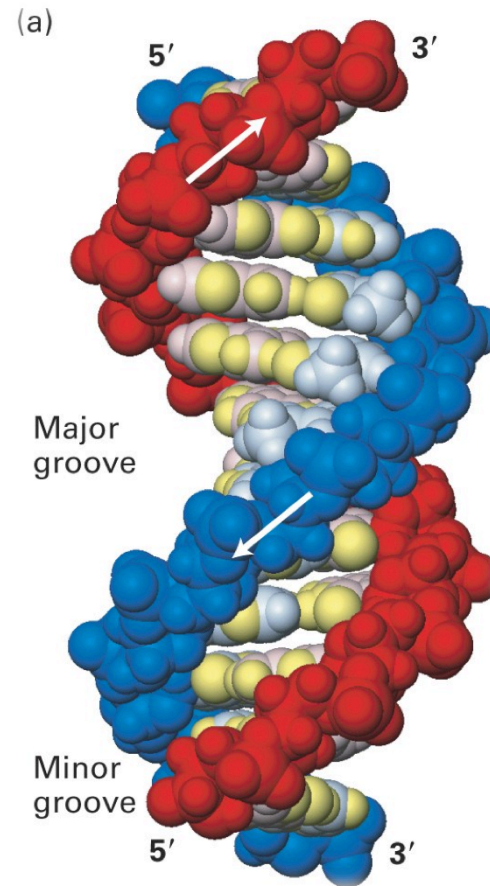
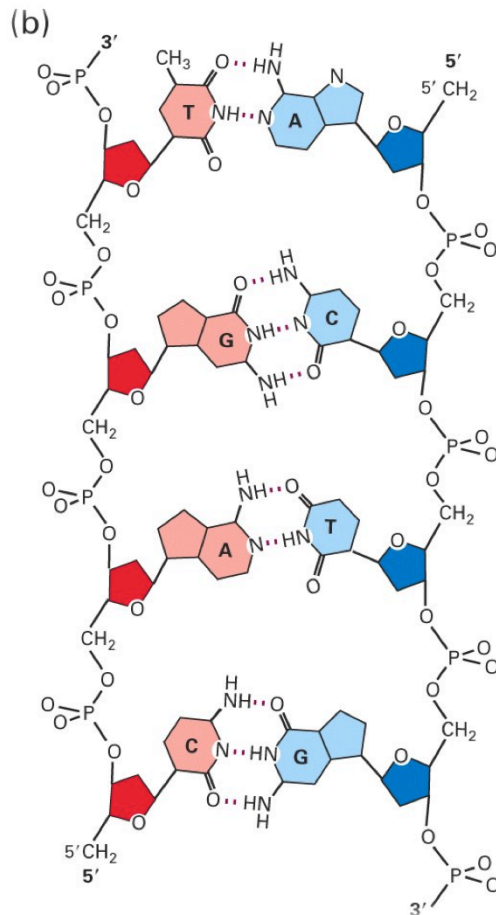


Figure 1-10  
*Genes and Genomics: A Short Course (3e)*  
 © 2007 W.H. Freeman and Company

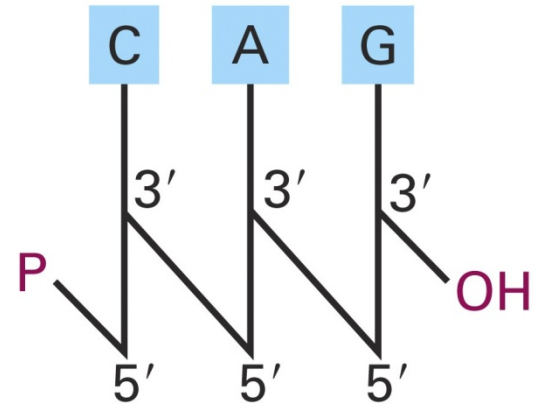
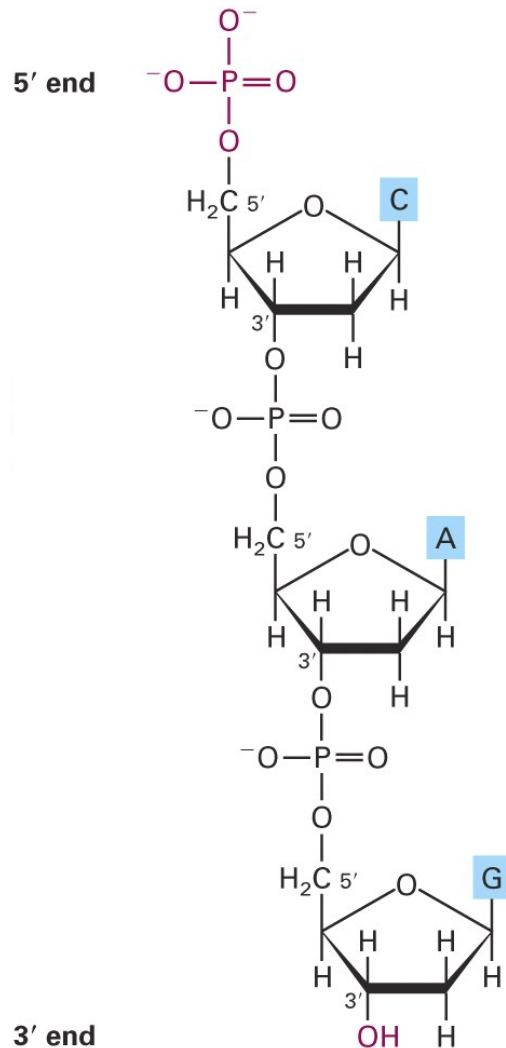
# Estructura Química de la Doble Hélice

La orientación de las dos cadenas es antiparalela.





# Representación de Ácidos Nucleicos

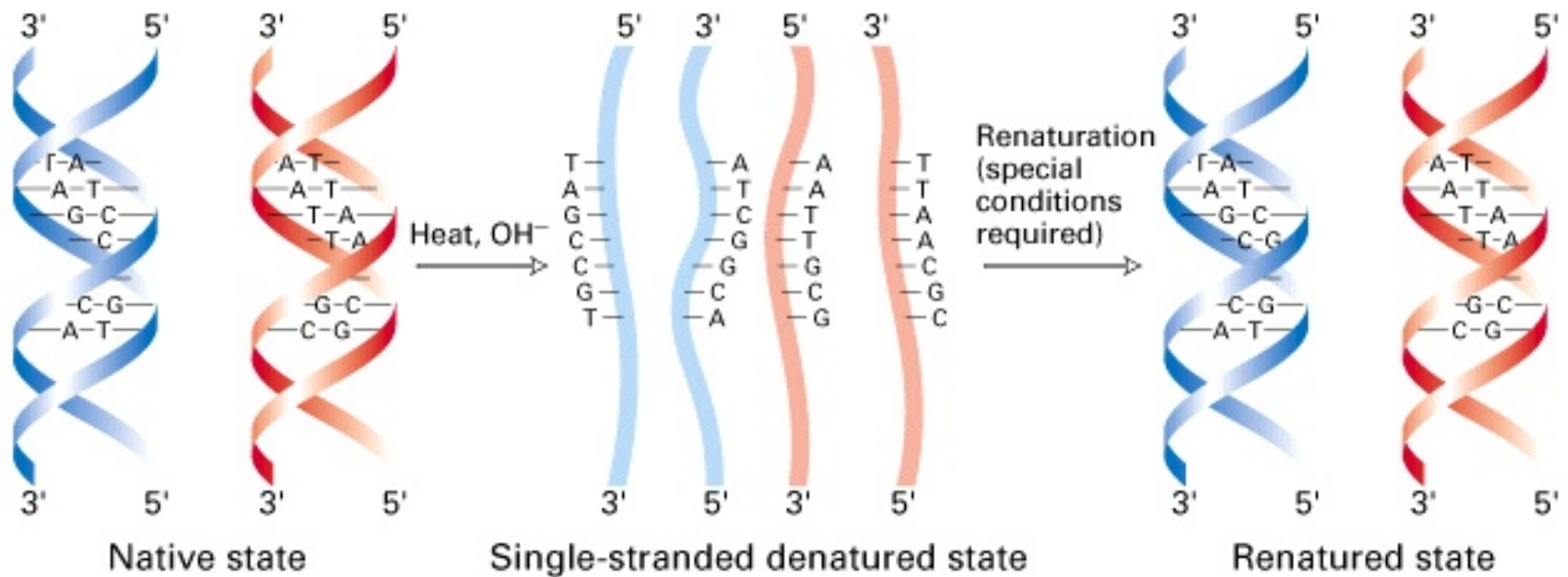


5' C-A-G 3'

C-A-G

Orientación 5' a 3'

# Denaturación-Renaturación



# **Enzimas de restricción**

# Endonucleasas de restricción

Enzimas de restricción

1962: “molecular scissors” descubiertas en bacterias

*E. coli* tiene un sistema inmune enzimático que reconoce y destruye el ADN extraño

3,000 enzimas se han identificado

# Endonucleasas de restricción

Su nombre se debe al género, especie, cepa, orden

Ejemplo: *EcoR*1

Género: *Escherichia*

Especie: *coli*

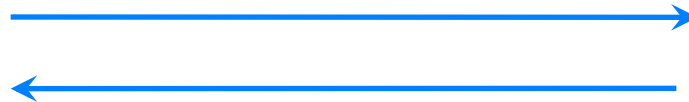
Cepa: *R*

Orden de descubrimiento: 1

# Endonucleasas de restricción

Los sitios de corte tienen simetría (palindrómica)

“Able was I, ere, I saw Elba”

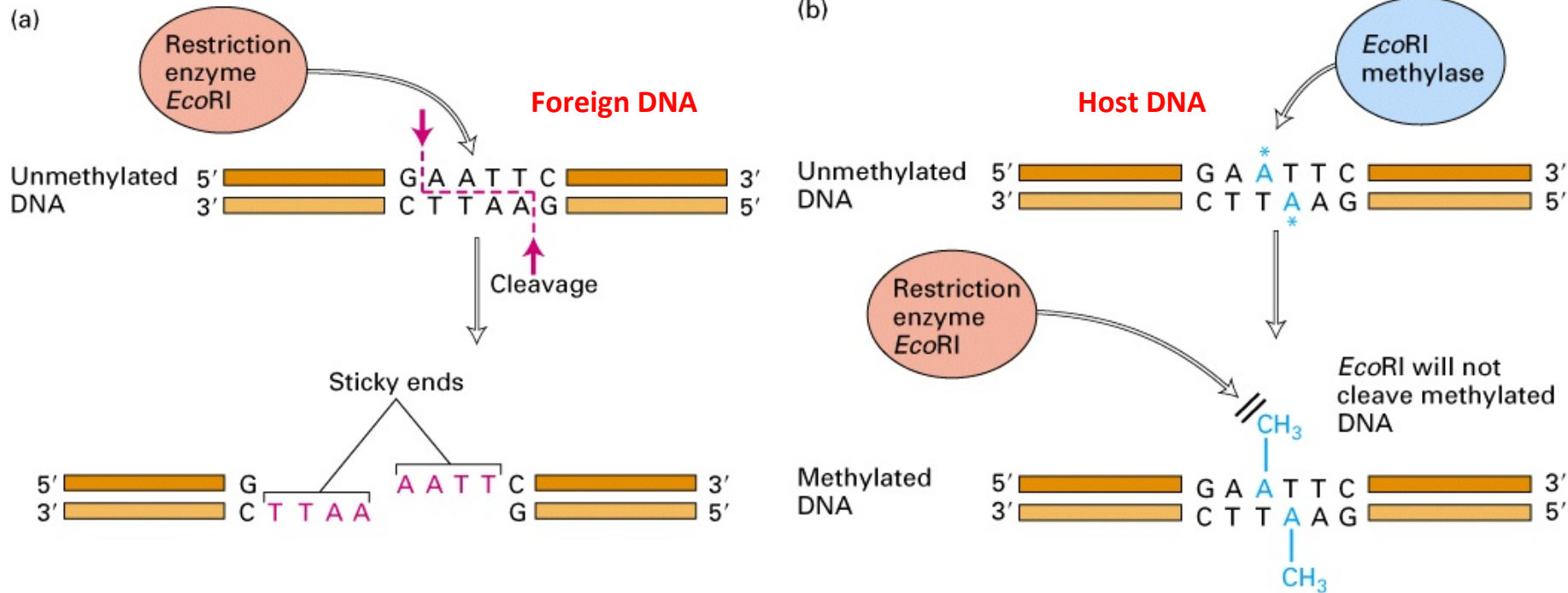


*Bam*H1 site:



## A: Restriction Endonucleases (enzymes that cleave DNA at specific sites)

### The Restriction-Modification System of Bacteria



#### Part I: Restriction

→ Bacteria produce restriction enzymes that digest foreign (viral DNA)

#### Part II: Modification

→ Bacteria methylate their DNA to protect it from digestion

# There are Three Types of Restriction Endonucleases

Properties of Restriction Endonucleases			
	Type I	Type II	Type III
Example	<i>EcoB</i>	<i>EcoRI</i>	<i>EcoPI</i>
Recognition site	TGAN <sub>8</sub> TGCT	GAATTC	AGACC
Cleavage site	About 1 kb away from recognition site	Between G and A (both strands)	24–26 base pairs 3' to recognition site
Methylation site	<div style="text-align: center;"> <math>\text{m}</math>              TGAN<sub>8</sub>TGCT              ACTN<sub>8</sub>ACGA  <math>\text{m}</math> </div>	<div style="text-align: center;"> <math>\text{m}</math>              GAATTC              CTTAAG  <math>\text{m}</math> </div>	<div style="text-align: center;"> <math>\text{m}</math>              AGACC              (only one strand methylated)           </div>
Nuclease and methylase in one enzyme?	Yes	No	Yes
Requirements for cleavage	ATP, Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet	Mg <sup>2+</sup> or Mn <sup>2+</sup>	Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet
Requirements for methylation	ATP, Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet	S-AdoMet	Mg <sup>2+</sup> , S-AdoMet

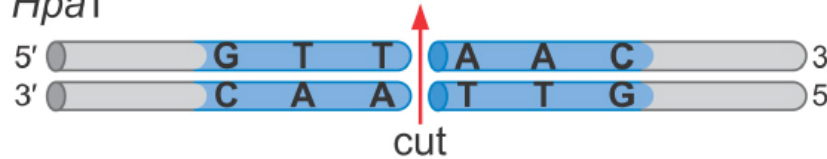
## Type II Restriction Enzymes are the Most Useful for Cloning

- 1) They recognize palindromic sequences → They make double-stranded cuts
- 2) They cut at the site of recognition → They generate predictable ends



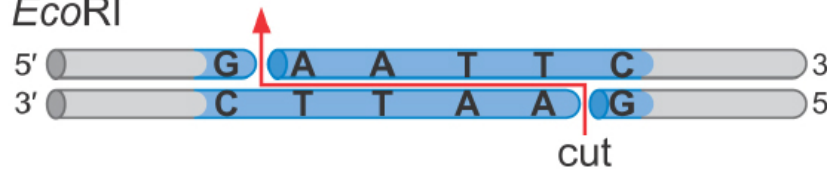
## Examples of Type II Restriction Endonucleases

*HpaI*

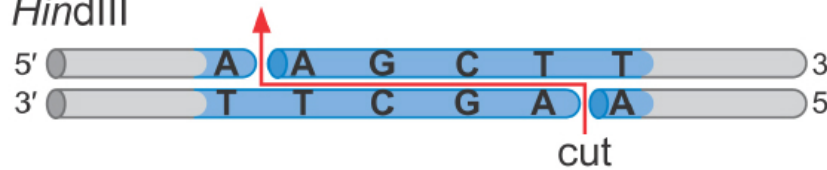


← Blunt ends

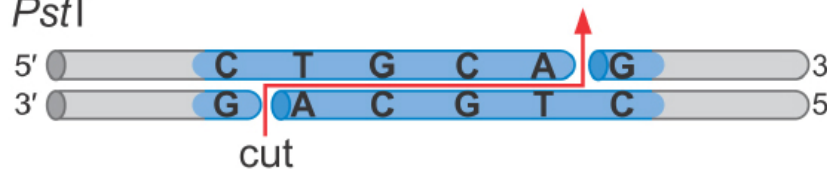
*EcoRI*



*HindIII*

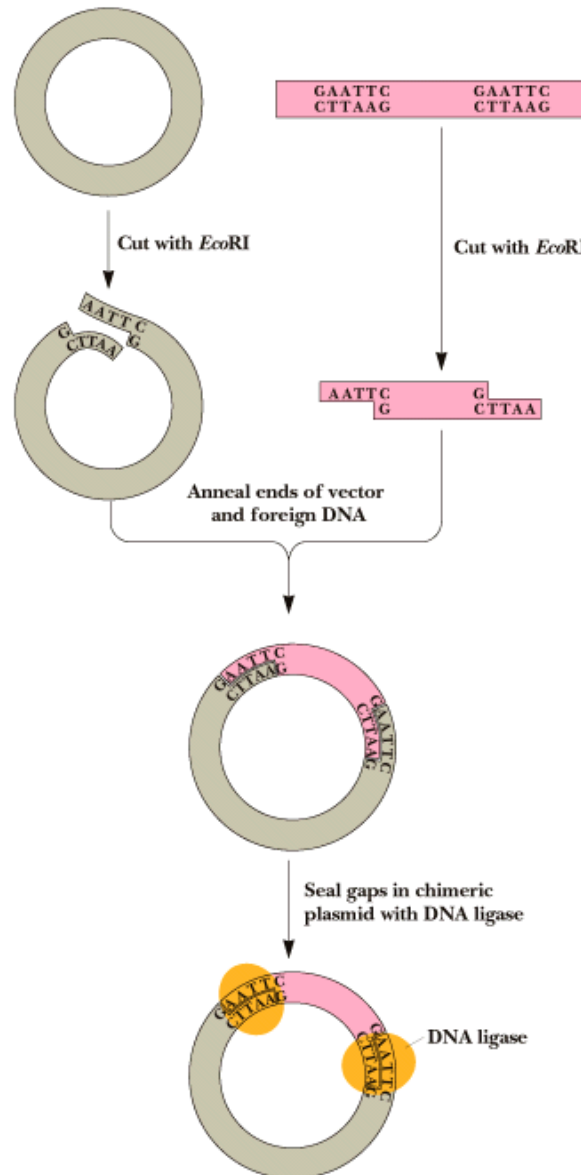


*PstI*



Cohesive  
"sticky" ends

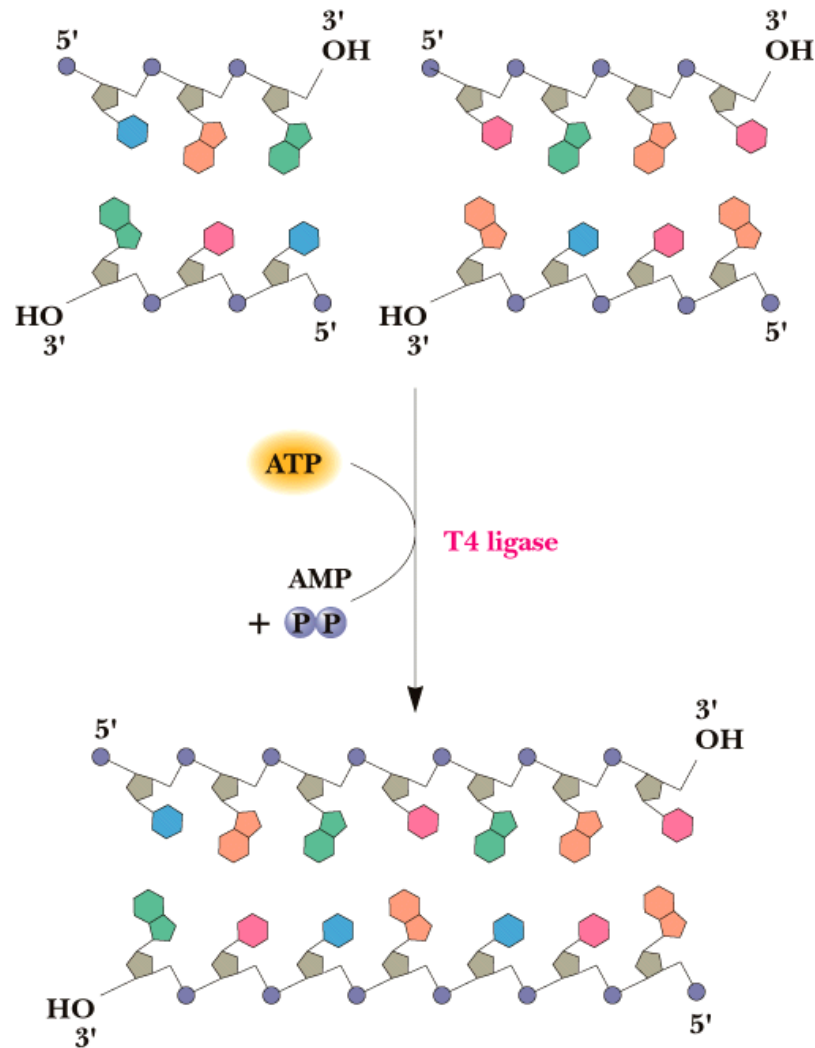
## An Example of a Sticky End Ligation



\*DNA ligase can also religate (reseal) a cut plasmid (ligate without the insert)!

## DNA Ligase

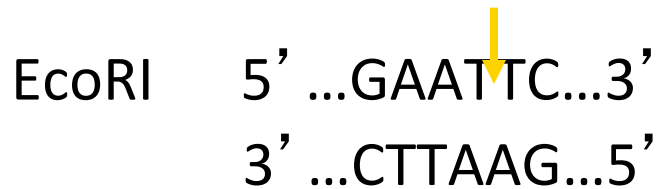
Catalyzes the formation of a phosphodiester bond between a 3' hydroxyl at the end of one DNA strand and the 5' phosphate at the end of another strand.



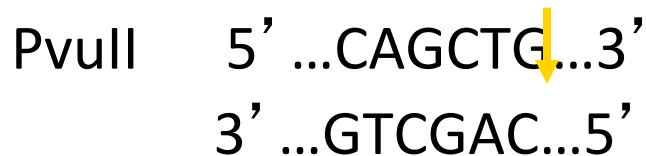
# Endonucleasas de restricción

Enzymes recognize specific 4-8 bp sequences

Some enzymes cut in a staggered fashion - “sticky ends”



Some enzymes cut in a direct fashion – “blunt ends”



# Usos para las enzimas de restricción

RFLP analysis (Restriction Fragment Length Polymorphism)

DNA sequencing

DNA storage – libraries

Transformation

Large scale analysis – gene chips

# Enzimas de restricción para transformación

## Human DNA cleaved with *EcoRI*

5' -C-G-G-T-A-C-T-A-G-OH  
3' -G-C-C-A-T-G-A-T-C-T-T-A-A-PO<sub>4</sub>

## Corn DNA cleaved with *EcoRI*

PO<sub>4</sub>-A-A-T-T-C-A-G-C-T-A-C-G-3'  
HO-G-T-C-G-A-T-G-C-5'

+

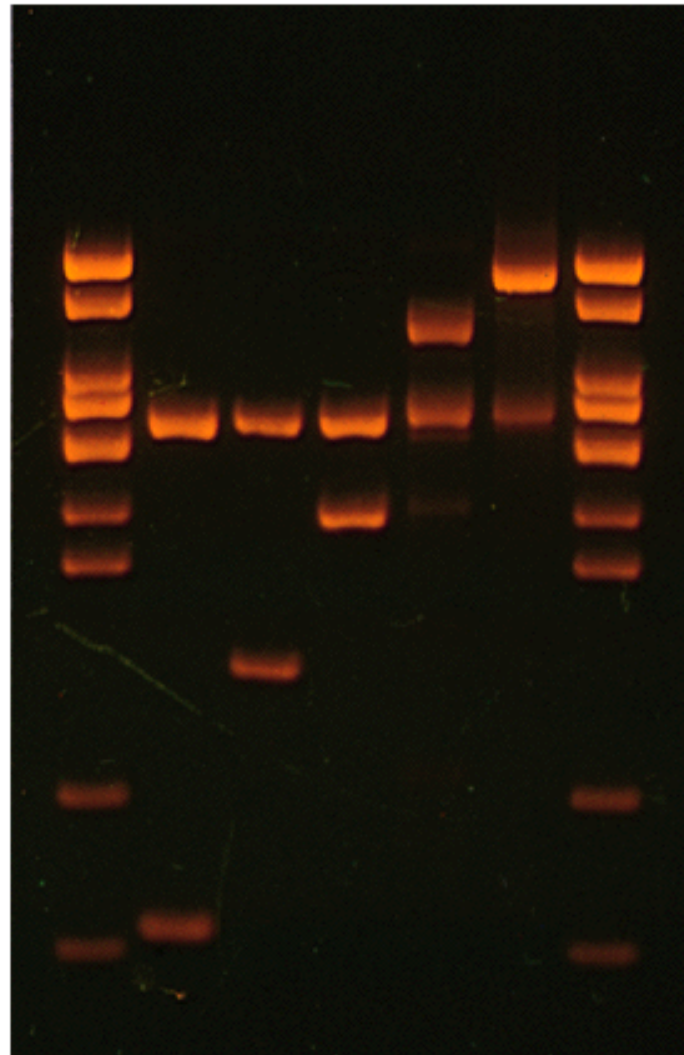
Complementary base pairing

5' -A-C-G-G-T-A-C-T-A-G A-A-T-T-C-A-G-C-T-A-C-G-3'  
3' -T-G-C-C-A-T-G-A-T-C-T-T-A-A G-T-C-G-A-T-G-C-5'

+ DNA Ligase, + rATP

5' -A-C-G-G-T-A-C-T-A-G-A-A-T-T-C-A-G-C-T-A-C-G-3'  
3' -T-G-C-C-A-T-G-A-T-C-T-T-A-A-G-T-C-G-A-T-G-C-5'

**recombinant DNA molecule**



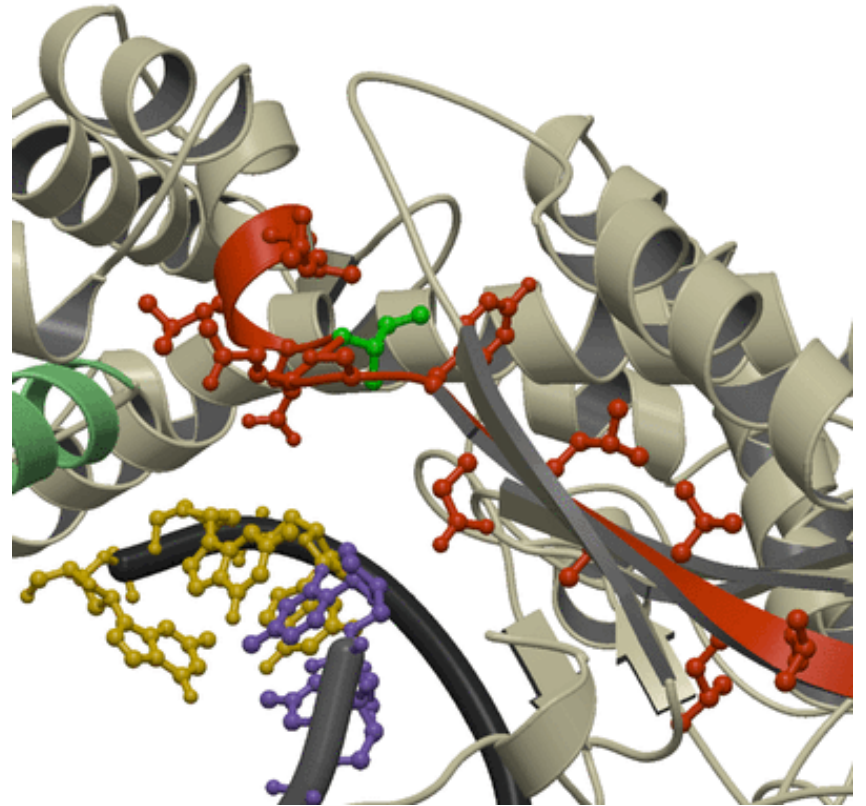
# Endonucleasas de restricción

Animación

<http://www.dnai.org/b/index.html>



# REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

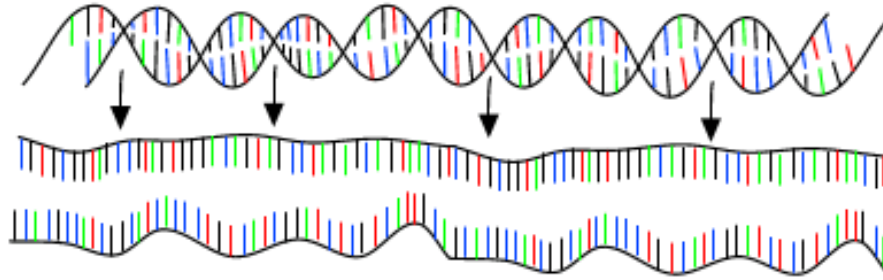


# Mezcla de Reacción

- Iniciadores (Primers )
- Taq Polimerasa
- ADN Templado
- Cloruro de Magnesio
- Buffer 10x
- Deoxinucleotidos (dNTPs)
- Agua Destilada Estéril

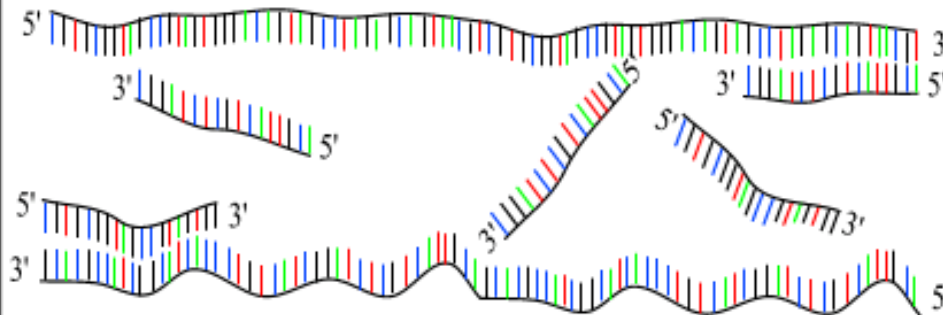
# PCR : Polymerase Chain Reaction

30 - 40 cycles of 3 steps :



Step 1 : denaturation

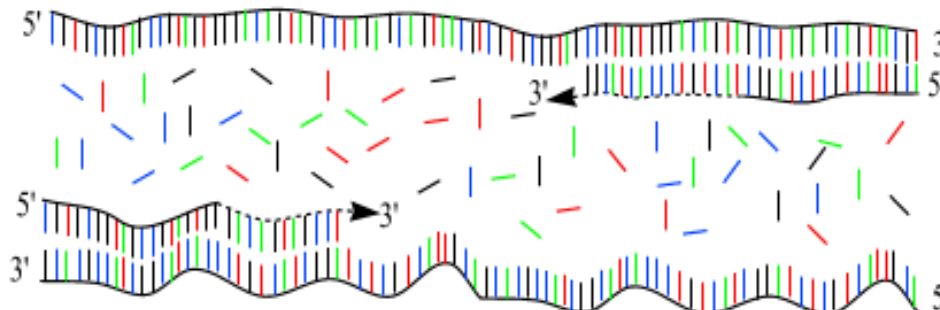
1 minut 94 °C



Step 2 : annealing

45 seconds 54 °C

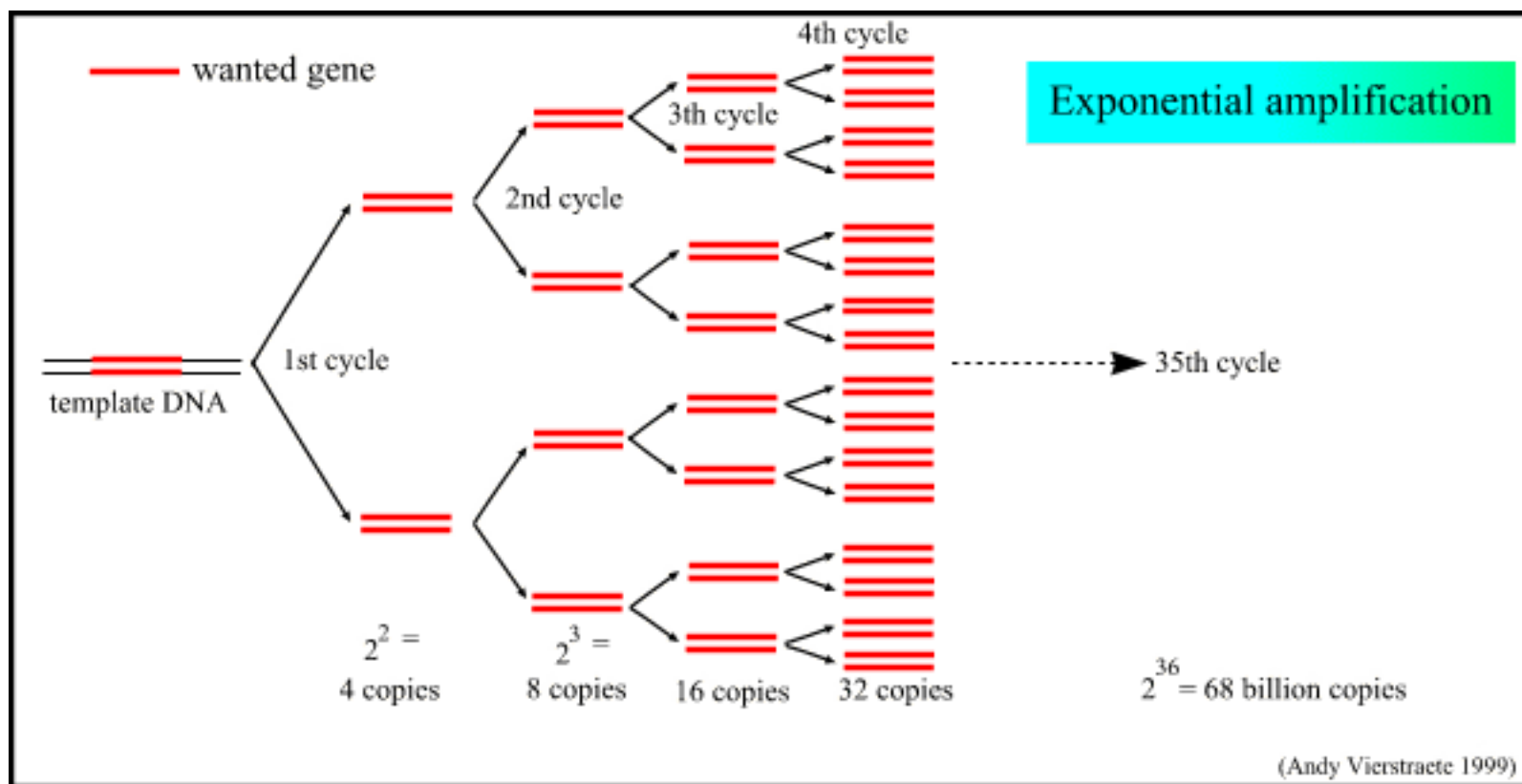
forward and reverse  
primers !!!



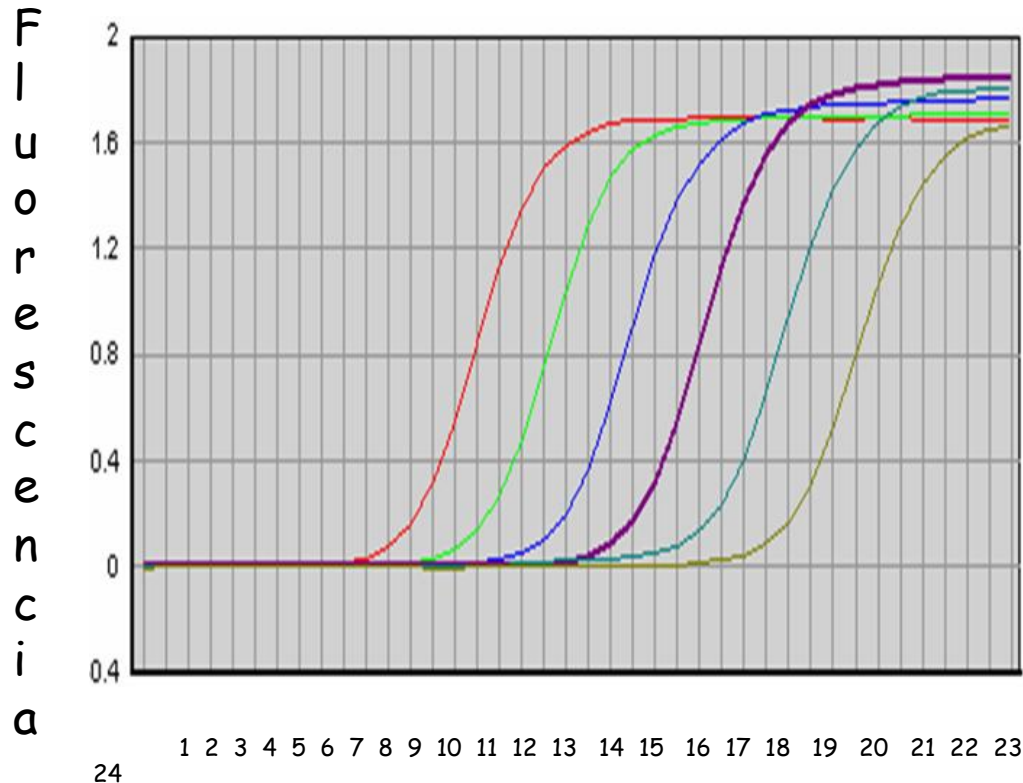
Step 3 : extension

2 minutes 72 °C

only dNTP's



# Fundamento de la PCR cuantitativa

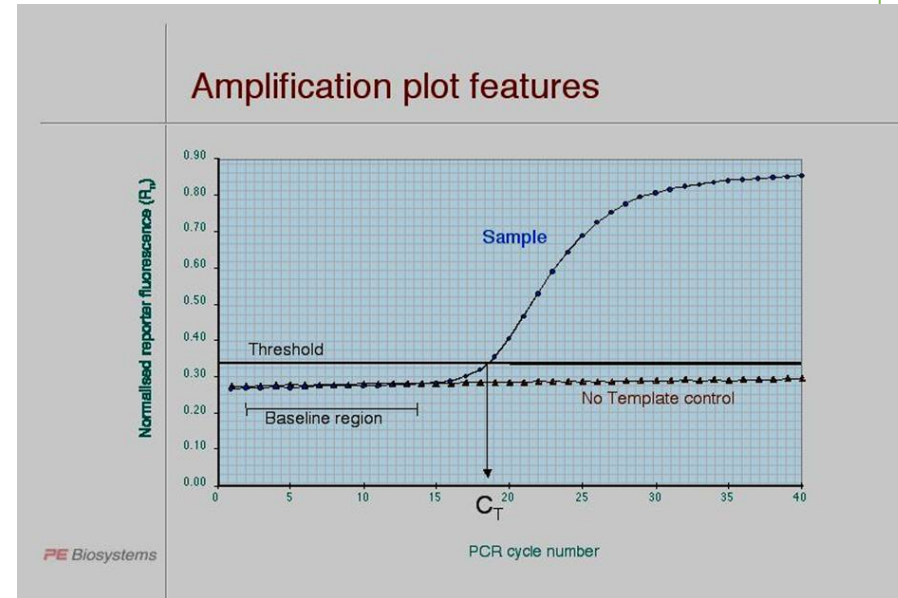


Número de ciclos

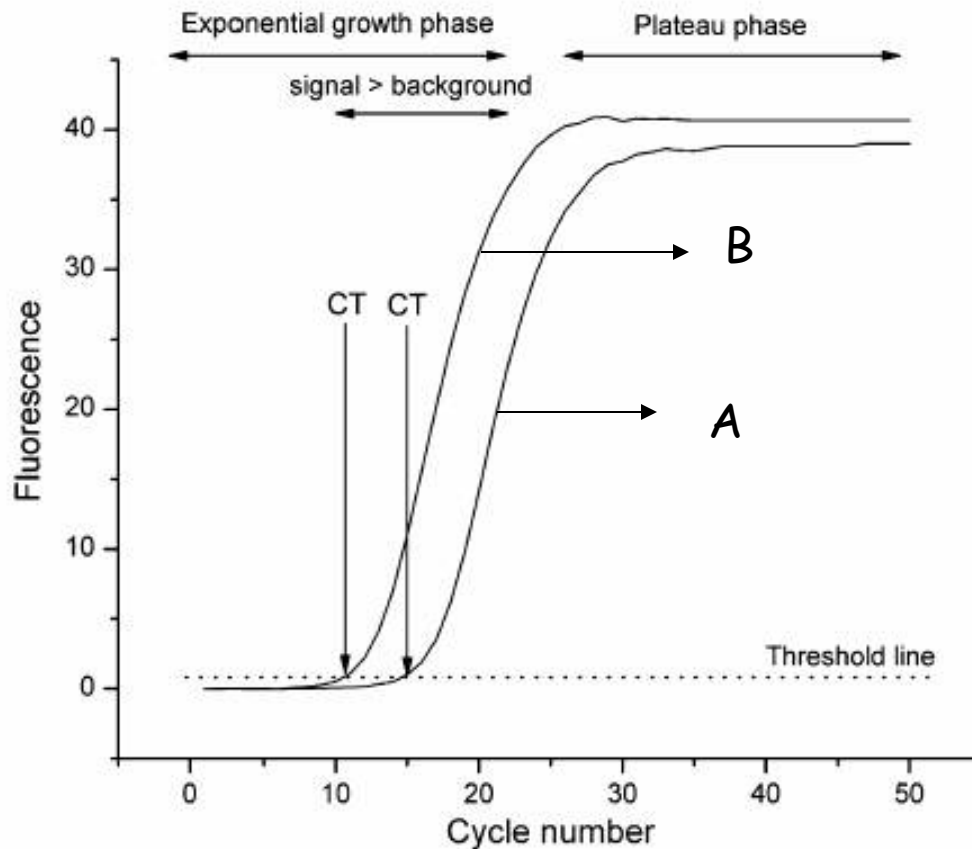
- Monitorea el proceso de la PCR en el momento en que ocurre: Tiempo Real, leyendo la intensidad de la fluorescencia luego de cada ciclo de amplificación
- A mayor cantidad de blanco de amplificación, la señal fluorescente se detecta en un número menor de ciclos

# DEFINICIONES EN qPCR

- ❖ LINEA BASE - Nivel basal de fluorescencia definido durante los ciclos iniciales de PCR. Background de fluorescencia
- ❖ UMBRAL - THRESHOLD - Nivel de fluorescencia fijo por encima de la línea base. Punto de corte seleccionado por encima del background
- ❖ Rn - Señal del reportero fluorescente normalizado. Nivel de fluorescencia detectado durante la PCR
- ❖ Ct - Threshold Cycle - Ciclo del umbral. Ciclo en el cual la fluorescencia sobrepasa el umbral y es detectada.



# Eficiencia de la Reacción en Cadena de la Polimerasa



100% Eficiencia

$$\frac{[N_0]_A}{[N_0]_B} = 2^{(CT_B - CT_A)}$$

Ct A = 14 y Ct B = 10

16X - A que B

90% Eficiencia

$$\frac{[N_0]_A}{[N_0]_B} = (1 + E)^{(CT_B - CT_A)}$$

$$(1 + 0.9)^4$$

Ct A = 14 y Ct B = 10

13X - A que B

# ¿Cómo se calcula la eficiencia?

*M. Kubista et al. / Molecular Aspects of Medicine 27 (2006) 95–125*

101

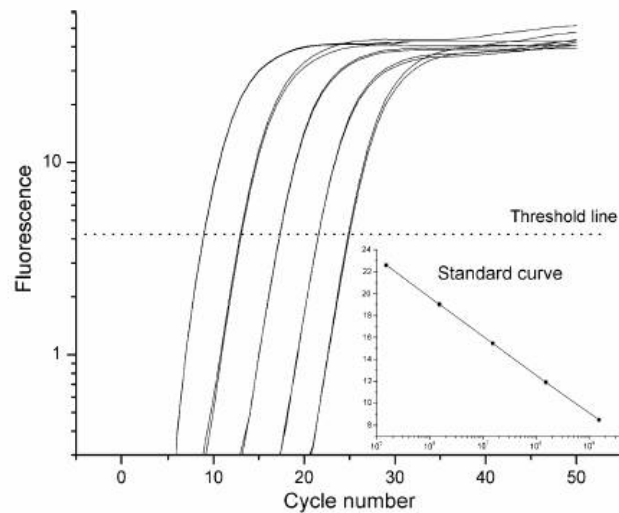


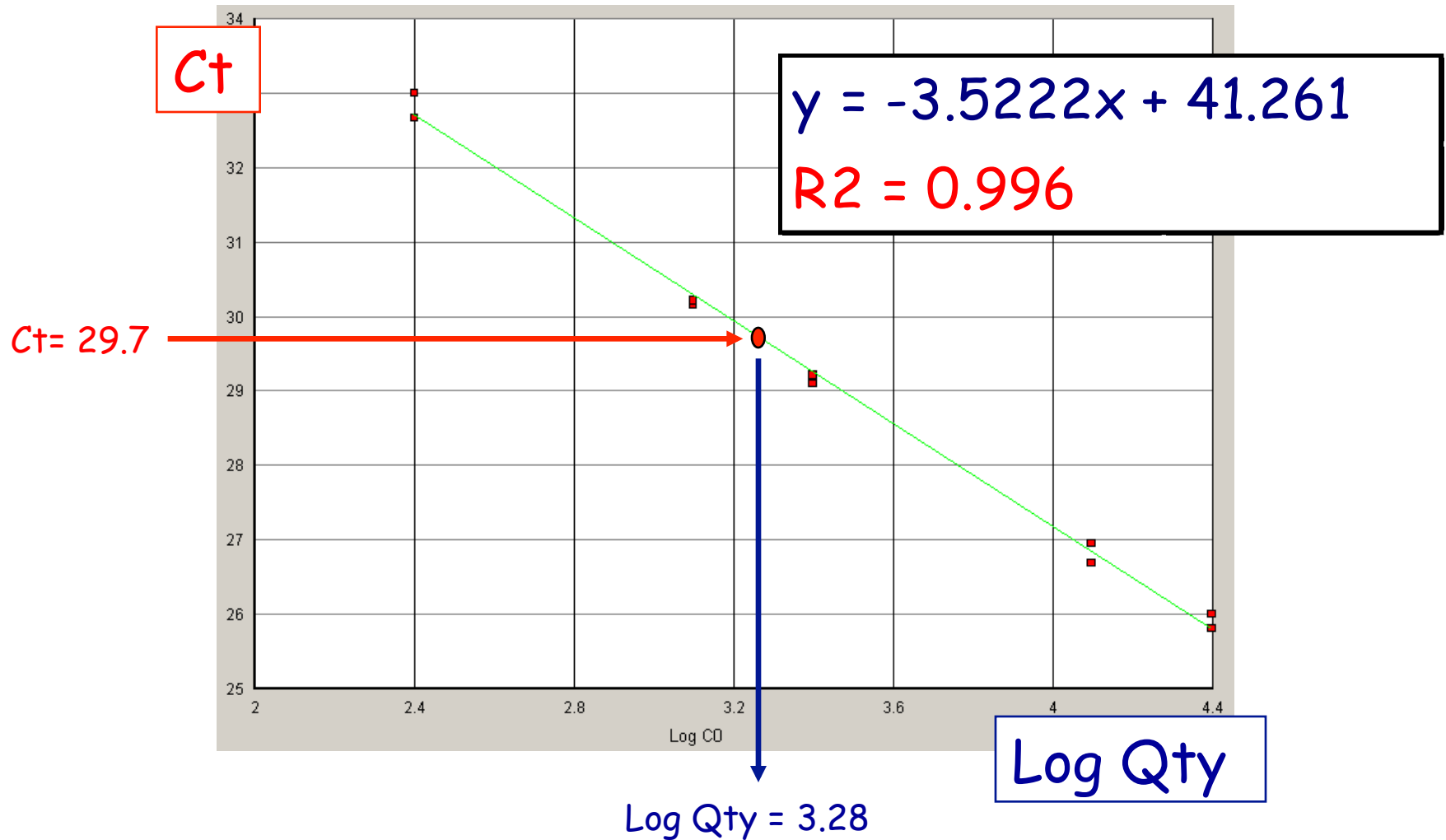
Fig. 4. Real-time PCR standard curve. Real-time PCR response curves shown in logarithmic scale for five standard samples. The crossing points with threshold line are the CT values. In the inset the CT values are plotted vs. the logarithm of the initial number of template copies in the standard samples.

La eficiencia de la qPCR puede ser estimada mediante curvas de calibración realizadas con diluciones seriadas de un estándar que puede ser DNA o un plásmido.

$$E = 10^{-\frac{1}{k}} - 1$$

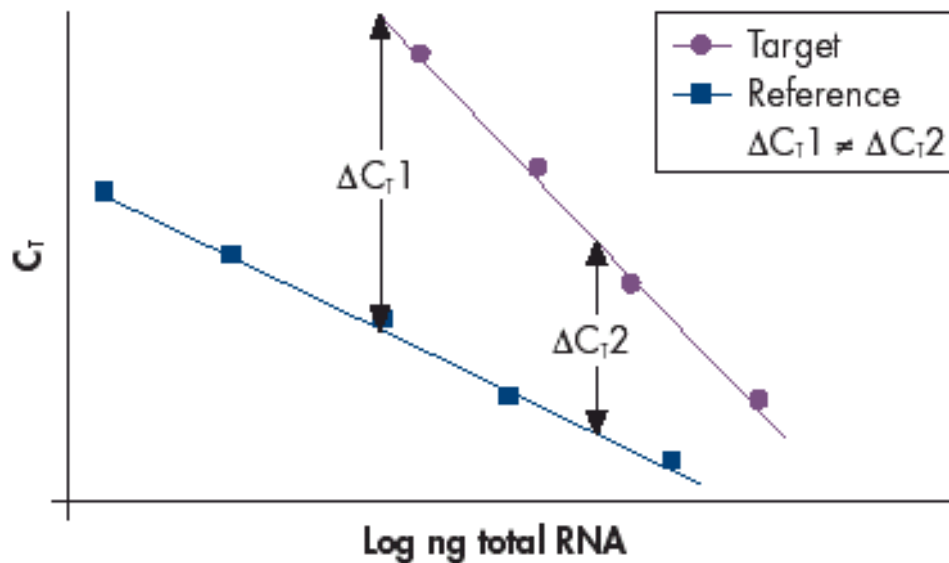


# Curva estándar



# Parámetros que afectan la eficiencia de PCR

Comparing PCR Efficiencies between Genes



**Figure 1** Typical standard curves showing amplification of two targets with different PCR efficiencies.

Pendiente aceptable entre -3.2 y -3.8

Eficiencias entre: 83 y 105%

- ❖ Especificidad de Primers y sondas

- ❖ Concentraciones altas de dNTPs

- ❖ Agentes inhibidores conocidos como hemoglobina, heparina, IgG

- ❖ Altas concentraciones de proteína

# real-time real-time real-time PCR hardware

- Intuitive programming
- Fast and accurate performance
- Flexibility for multiple users
- Small footprint

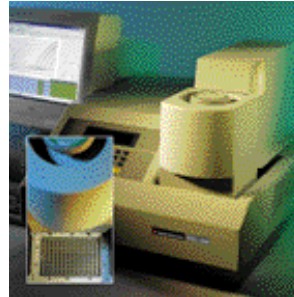


The optical module fits on the iCycler base unit, offering you Real Time Quantitative PCR\* capability.

**iCycler**  
BioRad



**LightCycler**  
Roche



**5700**  
Applied Biosystems



**7700**  
Applied Biosystems



**FluorTracker**  
Stratagene



**FluorImager**  
Molecular Dynamics

# ***Detección de PCR***

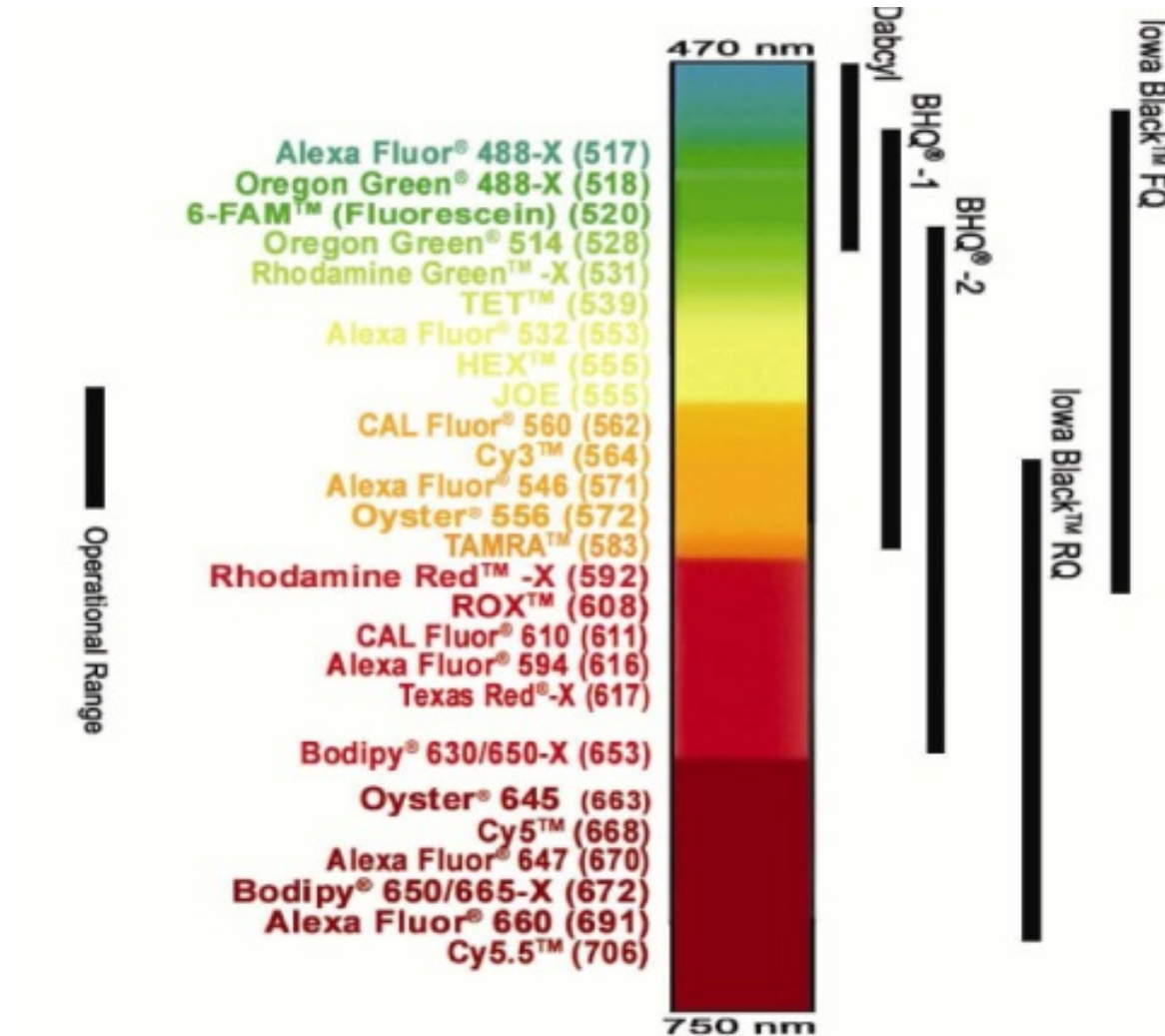
1. Sondas TaqMan
2. Molecular Beacons
3. Sondas de hibridación adyacentes
4. Sondas Escorpion
5. SYBR GREEN I

# FRET

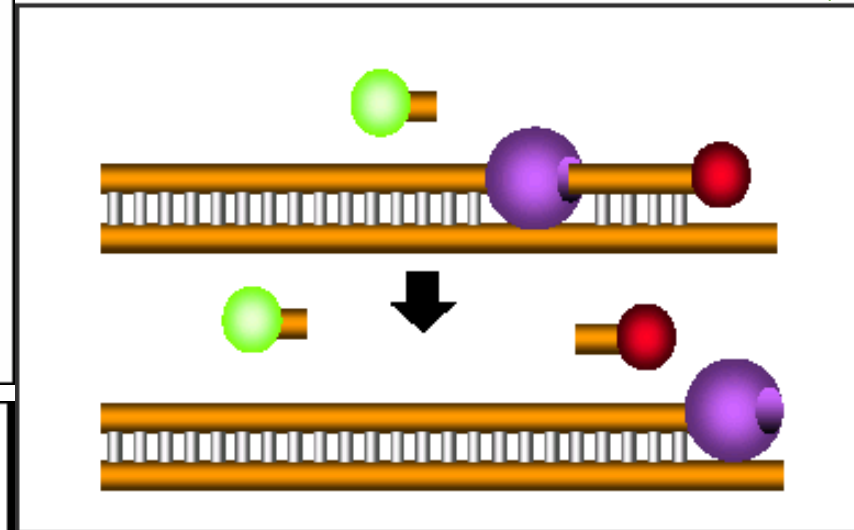
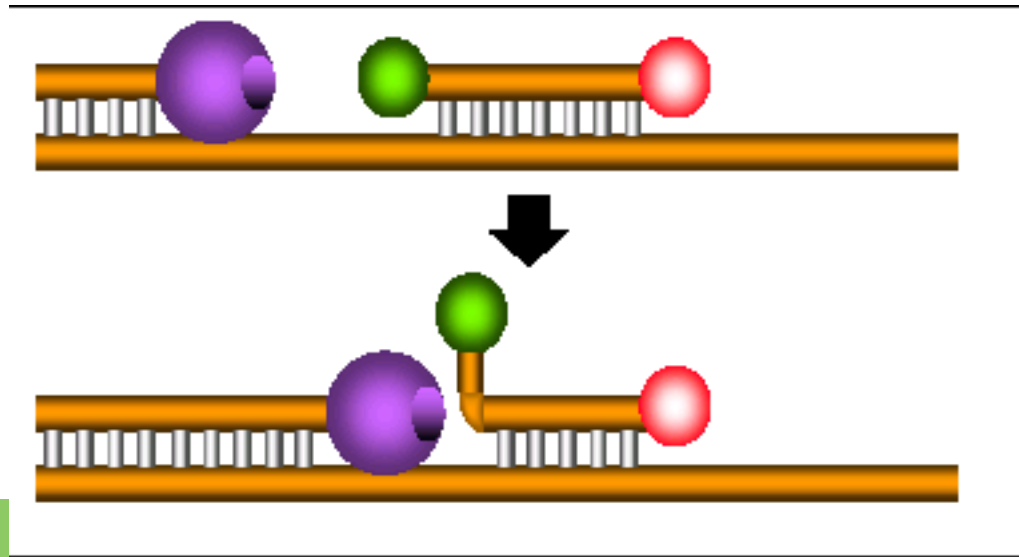
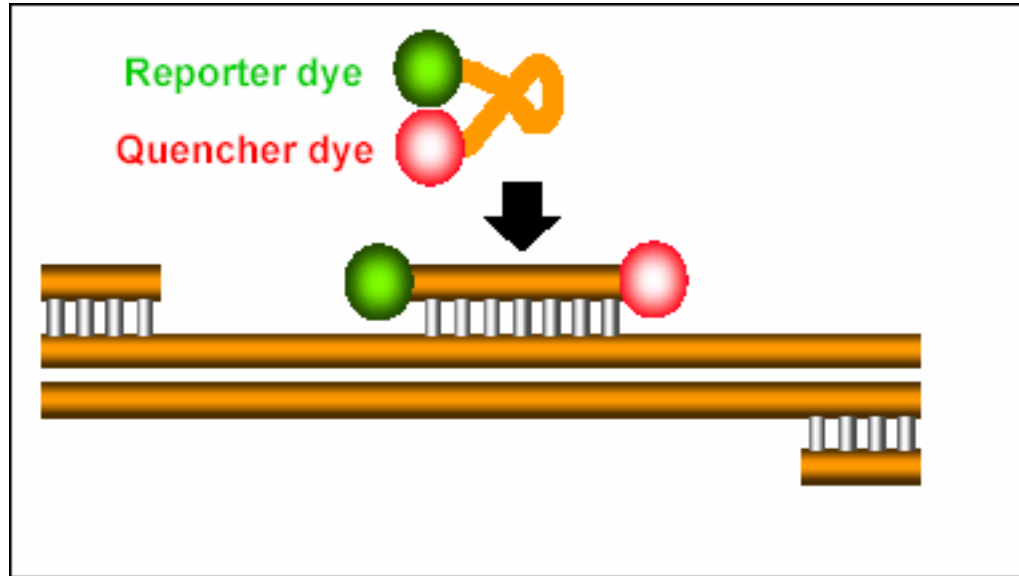
Fluorescence resonance energy transfer- Tiene como fundamento que cuando hay un colorante con una alta energía y este se encuentra muy próximo a uno de baja energía, habrá una transferencia energética entre alto y el bajo y no habrá emisión de fluorescencia.



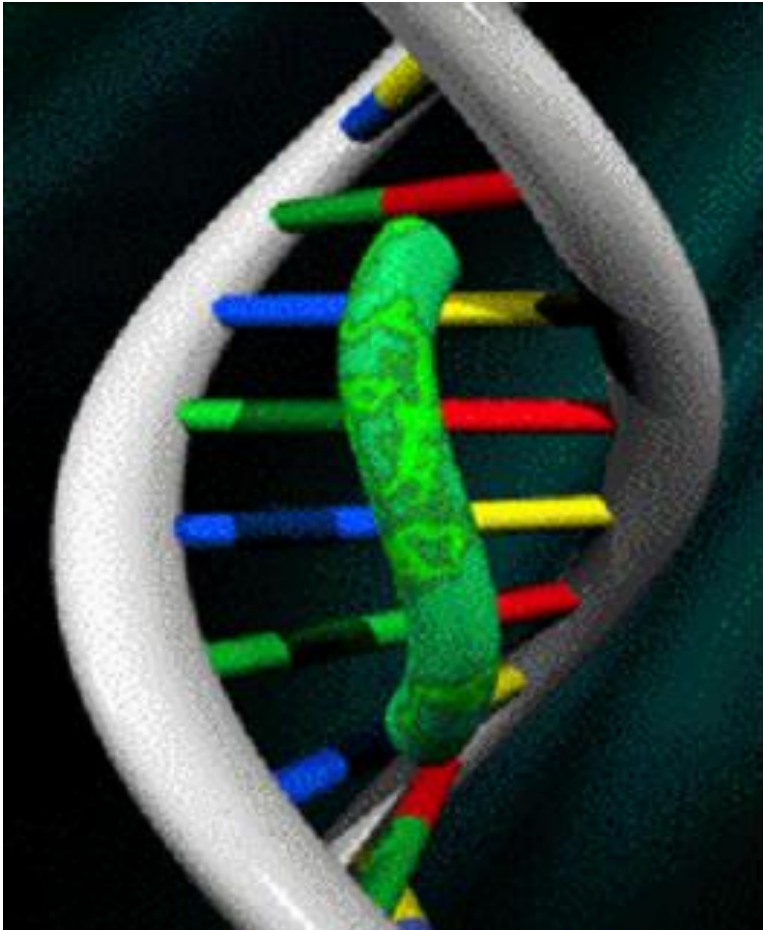
# FLUOROCROMOS Y SUPRESORES (QUENCHERS)



# Sondas TaqMan



# SYBR Green I



- Afinidad por la doble cadena de DNA (100 veces la del Br Etidio)
- La fluorescencia en doble cadena es 1000 la del colorante libre
- Excita a 480 nm y fluoresce a 520 - 530
- No específico

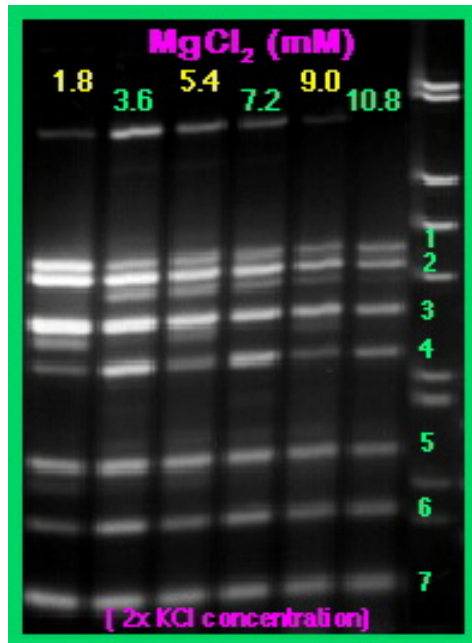


# Los reactivos

- ¿Y la Taq? Es siempre la misma? ¿Qué es *Pfu*? ¿*Pfx*? ¿PHI29?
- Y los primers degenerados
- Y la concentración de  $\text{MgCl}_2$

# Los componentes de la PCR

- Iones  $Mg^{++}$



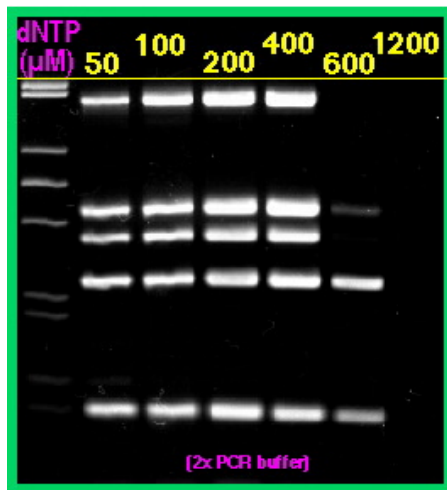
- Mg es un cofactor esencial de la polimerasa de ADN
- Cantidad puede variar
  - 0.5 a 3.5 uM
  - Muy bajo: Taq no va a trabajar
  - Muy alto: mispriming



- Afecta: Anillaje de los primers, las temperaturas de disociación del templado y del producto, la especificidad, formación de artefactos de dímeros de primers y la fidelidad y la especificidad de la enzima
- Ya lo veremos, aumentar la concentración de MgCl<sub>2</sub> hace que la PCR se vuelva mutagénica

# Los componentes de la PCR

- Nucleótidos



- 20-400  $\mu\text{M}$  funciona bien

- Mucho: mispriming y errores
- Mucho: pueden tomar el  $\text{Mg}^{++}$
- Poco: Productos fantasmas o débiles

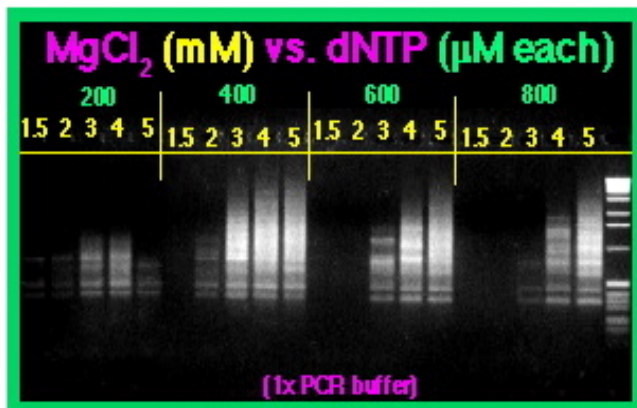
- Edad

- Número de descongelados

- Solo 3-5 ciclos es suficiente para que no funcione

- Diluir en buffer (eg. 10mM Tris pH 8.0 para prevenir hidrólisis ácida)

- Contaminación



# Polimerasas

- DNA polimerasas para PCR :Termoestables

DNA Polymerase	Source
<b><i>Taq</i></b>	<b><i>Thermus aquaticus</i></b>
<b>Amplitaq®</b>	<b><i>Thermus aquaticus</i></b>
<b>Hot <i>Tub</i>™</b>	<b><i>Thermus flavis</i></b>
<b>Pyrostase™</b>	<b><i>Thermus flavis</i></b>
<b>Vent™</b>	<b><i>Thermococcus litoralis</i></b>
<b>Deep Vent™</b>	<b><i>Pyrococcus GB-D</i></b>
<b><i>Tth</i></b>	<b><i>Thermus thermophilus</i></b>
<b><i>Pfu</i></b>	<b><i>Pyrococcus furiosus</i></b>
<b>ULTma™</b>	<b><i>Thermotoga maritima</i></b>

**TABLE 8-2 Activities and Functions of DNA Polymerases**

<b>Prokaryotic (<i>E. coli</i>)</b>	<b>Number of subunits</b>	<b>Function</b>
Pol I	1	RNA primer removal, DNA repair
Pol II (Din A)	1	DNA repair
Pol III core	3	Chromosome replication
Pol III holoenzyme	9	Chromosome replication
Pol IV (Din B)	1	DNA repair, Trans Lesion Synthesis (TLS)
Pol V (UmuC, UmuD' <sub>2</sub> C)	3	TLS

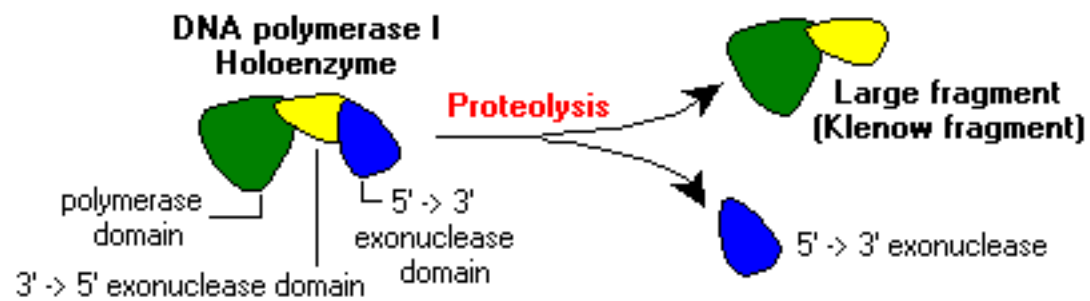
  

<b>Eukaryotic</b>	<b>Number of subunits</b>	<b>Function</b>
Pol $\alpha$	4	Primer synthesis during DNA replication
Pol $\beta$	1	Base excision repair
Pol $\gamma$	3	Mitochondrial DNA replication and repair
Pol $\delta$	2–3	DNA replication; nucleotide and base excision repair
Pol $\epsilon$	4	DNA replication; nucleotide and base excision repair
Pol $\theta$	1	DNA repair of crosslinks
Pol $\zeta$	1	Translesion synthesis (TLS)
Pol $\lambda$	1	Meiosis-associated DNA repair
Pol $\mu$	1	Somatic hypermutation
Pol $\kappa$	1	TLS
Pol $\eta$	1	Relatively accurate TLS past <i>cis-syn</i> cyclobutane dimers
Pol $\iota$	1	TLS, somatic hypermutation
Rev1	1	TLS

Source: Data from Sutton and Walker, 2001 and references therein.

# DNA polimerasas eucariotas

- Procariotas tienen 3 actividades:
  - Polimerasa 5' - 3'
  - Exonucleasa 5' - 3' (eliminar el primer)
  - Exonucleasa 3' - 5' (corregir)
- Las eucariotas:
  - No tienen actividad exonucleasa 5' - 3' (esta función la hace otra proteína aparte)
  - Solo las que elongan ( $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ) tienen exo 3' - 5'



<http://www.vivo.colostate.edu/hbooks/genetics/biotech/enzymes/klenow.html>



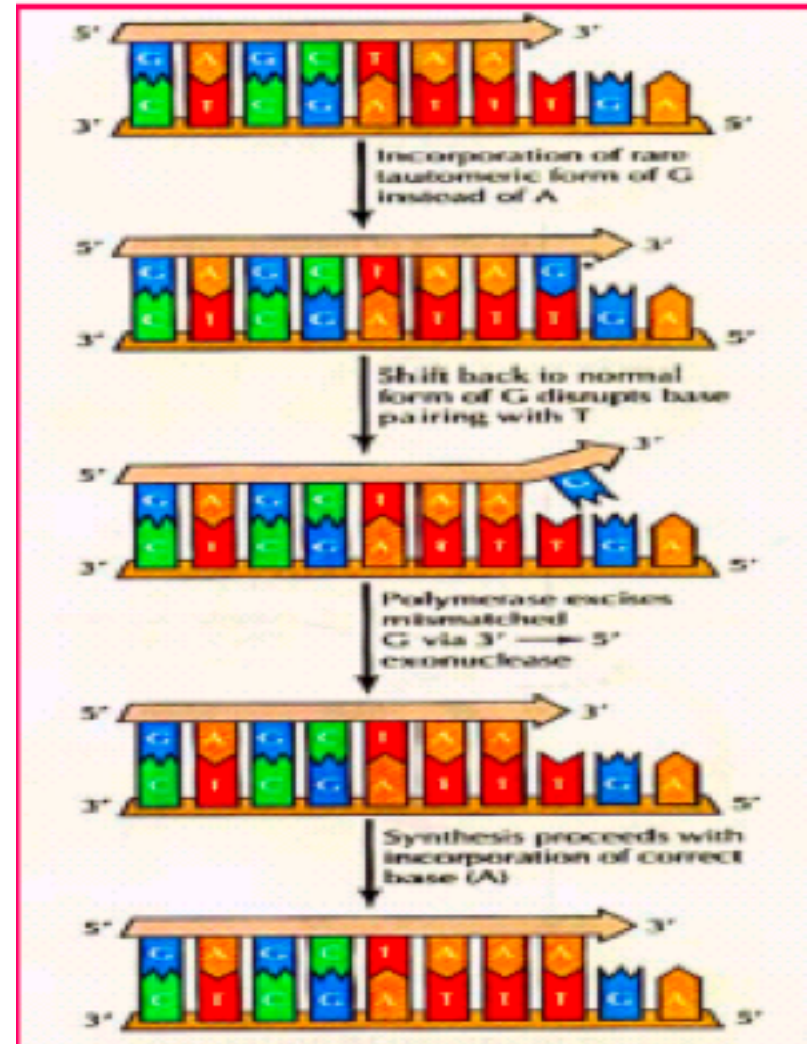
# Polimerasas

## Diferencias entre Taq y Pfu

### 1. Actividad 3' → 5' exonucleasa

Polimerasas con esta actividad tienen menor tasa de error, corrigen el último nt mal incorporado (proofreading)

- \* Taq no actividad 3' → 5' exonucleasa: mayor cantidad de errores ( $1.1 \times 10^{-4}$  sustituciones / base)
- \* Pfu si tiene actividad ( $1.6 \times 10^{-6}$  errores/ base)



# Polimerasas

## Diferencias entre Taq y Pfu

### 2. Actividad transferasa terminal

\*Pfu no tiene actividad transferasa terminal:  
productos de PCR con extremos romos  
(blunt ends)

Para clonar o agregar 3' – A y ligar en  
vectores con 3' – T overhangs o clonar en  
vectores blunt



# Polimerasas

## Diferencias entre Taq y Pfu

### 3- Velocidad de síntesis

- Taq: más rápida (2000 nucleótidos / min)
- Pfu más lenta (500nt/min)

Importante para determinar el tiempo de elongación

### 4- Termoestabilidad

- Pfu: vida media 18-25h a 95°C
- Taq: menos de 1h a 95°C (tener en cuenta la duración de la PCR)
- Pfu: temperaturas de denaturación más altas (98°C). Importantes para productos de PCR ricos en GC

# Phi29 DNA polymerase isothermal reaction

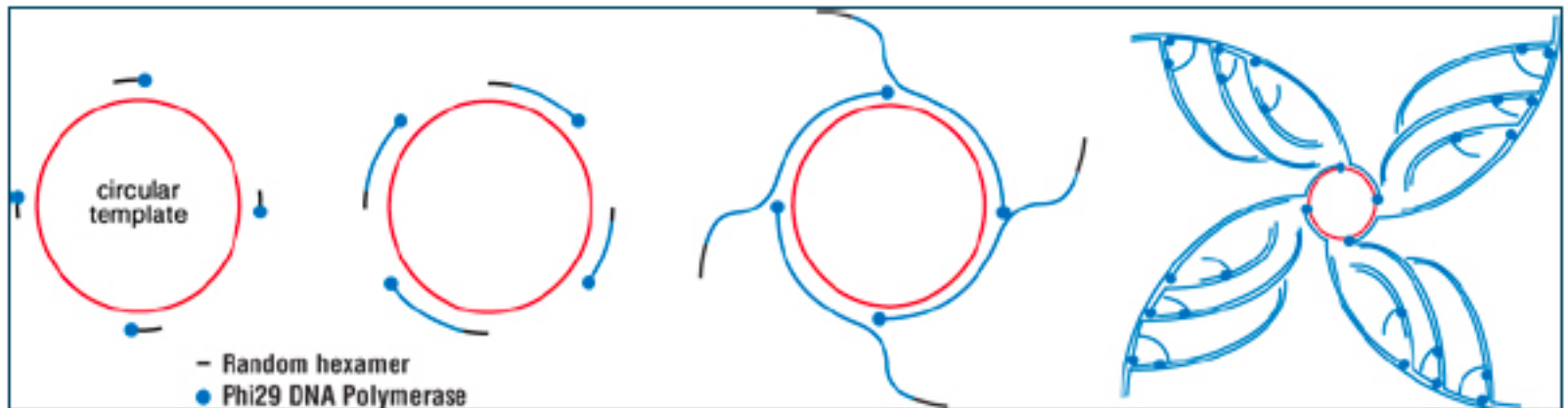
## *picograms to micrograms of eDNA*

A 30°C sin termociclador

En la naturaleza los virus y plásmidos se replican por el mecanismo del ROLLING CIRCLE (RCA)

Se usan muchos primers al azar y funciona por desplazamiento de la hebra no templado

Los primers al azar permiten la copia de las dos hebras



its capacity to perform strand displacement DNA synthesis for more than 70,000 nt without dissociating from the template

# PRIMERS

[http://www.premierbiosoft.com/  
tech\\_notes/PCR\\_Primer\\_Design.html](http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/PCR_Primer_Design.html)

# Los componentes de la PCR

- Primers
- Edad
- Número de veces descongelados
- Contaminación
- Cantidad
  - Can vary over a wide range (50X)
  - Más común: 100-500 nM
  - Muy bajo: baja amplification
  - Muy alto: low amplification

# Temperatura de anillaje

T<sub>a</sub> es la temperatura a la cual los primers se anillan con el ADN templado, se puede calcular a partir del T<sub>m</sub>

$$T_a = T_{m\_primer} - 5^{\circ}\text{C}$$

# Temperatura de anillaje

$$T_a = 0.3 \times T_m(\text{primer}) + 0.7 T_m (\text{product}) - 14.9$$

donde,

$T_m(\text{primer})$  =  $T_m$  de los primers

$T_m(\text{product})$  =  $T_m$  del producto



### Accepted Nucleic Acid codes:

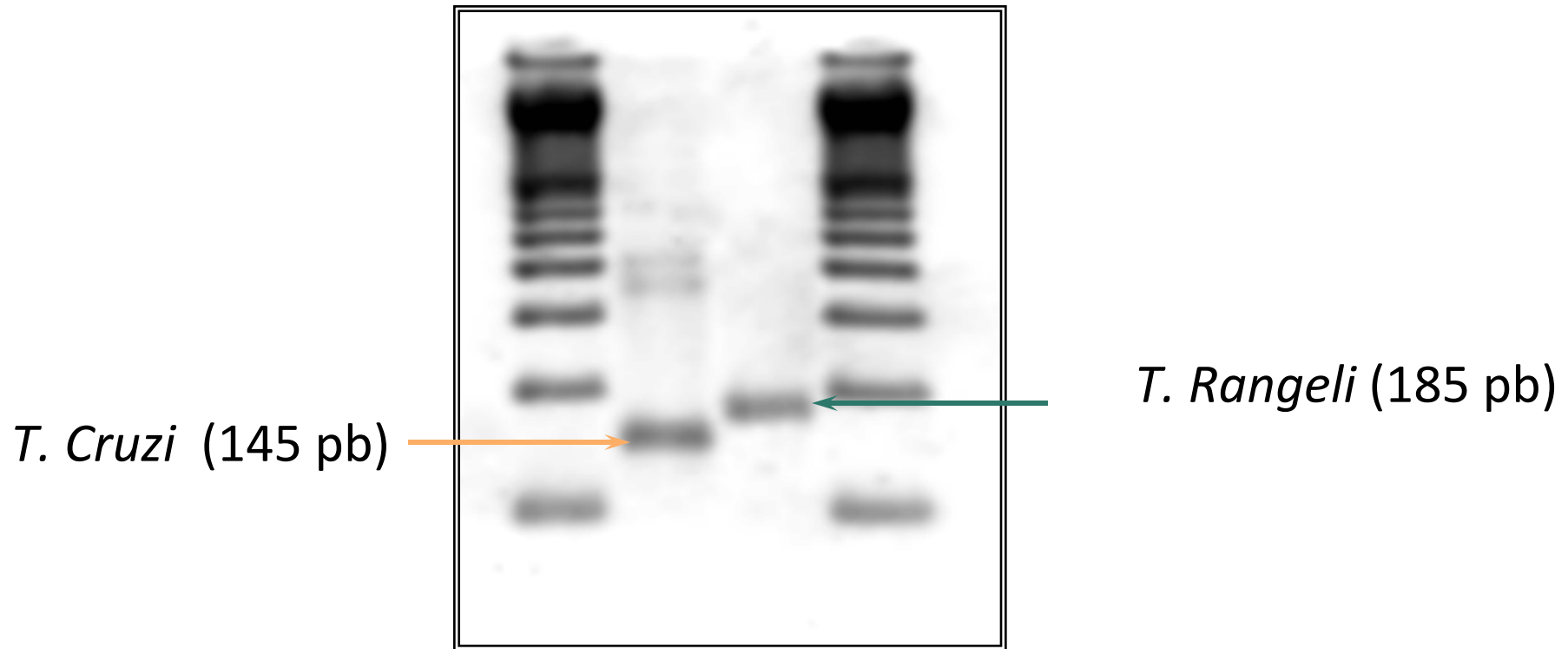
A --> adenosine	M --> A C (amino)
C --> cytidine	S --> G C (strong)
G --> guanine	W --> A T (weak)
T --> thymidine	B --> G T C
U --> uridine	D --> G A T
R --> G A (purine)	H --> A C T
Y --> T C (pyrimidine)	V --> G C A
K --> G T (keto)	N --> A G C T (any)

### Accepted amino acid codes:

A alanine	P proline
B aspartate or asparagine	Q glutamine
C cystine	R arginine
D aspartate	S serine
E glutamate	T threonine
F phenylalanine	U selenocysteine
G glycine	V valine
H histidine	W tryptophan
I isoleucine	Y tyrosine
K lysine	Z glutamate or glutamine
L leucine	X any
M methionine	* translation stop
N asparagine	

# Productos de PCR

## Determinación del Peso Molecular



- 1 y 4 - Marcadores moleculares
- 2 - *T. cruzi*
- 3 - *T. rangeli*